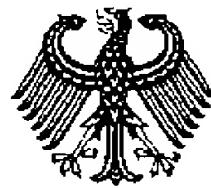


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



11011 U.S. PTO
09/963668
09/27/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 30 192.8

Anmeldetag: 22. Juni 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

Priorität: 30.09.2000 DE 100 48 605.3
09.11.2000 DE 100 55 516.0

IPC: C 12 N, C.07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Dr Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
5 unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das pckA-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Tierernährung, in der
10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli und Serratia marcescens, herzustellen. Wegen der großen
15 Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne

Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

5 Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren, und in denen die für das Enzym
15 Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) (EC 4.1.1.49) kodierende Nukleotidsequenz (pckA-Gen) abgeschwächt wird.

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich
20 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Homoserin und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist
25 L-Threonin.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen

Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das pckA-Gen abgeschwächt wird,
- 10 b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- 15 c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

Escherichia coli TF427
Escherichia coli H4578
Escherichia coli KY10935
Escherichia coli VNIIgenetika MG442
30 Escherichia coli VNIIgenetika M1
 Escherichia coli VNIIgenetika 472T23
 Escherichia coli BKIIM B-3996
 Escherichia coli kat 13
 Escherichia coli KCCM-10132

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

5 Serratia marcescens HNr21
 Serratia marcescens TLr156
 Serratia marcescens T2000

L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt unter anderen ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale 10 ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borreolidin, Resistenz 15 gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit 20 für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L- 25 Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, 30 Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd- 35 Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-

Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-
5 Genproduktes, Verstärkung der Malat:Chinon Oxidoreduktase und Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase und Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere
10 Ausschaltung des für die PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.49) kodierenden pckA-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenz des pckA-Gens von Escherichia coli wurde von Medina et al. (Journal of Bacteriology 172, 7151-
15 7156 (1990) publiziert und kann ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453 - 1462 (1997) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des pckA-Gens von Escherichia coli ist in SEQ ID No. 1 und die Aminosäuresequenz des dazugehörigen
20 Genproduktes in SEQ ID No. 2 dargestellt.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen pckA-Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des pckA-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch
25 funktionsneutrale Sinnmutationen (sense mutations) ergeben.

Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression des pckA-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen
30 kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der
35 Genexpression sind beispielsweise Repressorgene,

Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and 5 Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15, 58-64 (1999), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3, 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von 10 Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der 15 katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95, 5511-5515 20 (1998), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839 (1991) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen 25 werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense 30 mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder 35 die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung

derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen das pckA-Gen von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden kann, ist das Plasmid pMAK705ΔpckA (Figur 1). Es enthält lediglich einen Teil der 5'- und einen Teil der 3'-Region des pckA-Gens. Ein 349 bp langer Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese des pckA-Gens einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 3 dargestellt.

Die Deletionsmutation des pckA-Gens kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 1999, 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842-847 (2000)) können ebenfalls benutzt werden.

Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 4 dargestellte Form des ΔpckA-Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen im pckA-Gen oder Mutationen, die die Expression des pckA-Gens betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des pckA-Gens ein oder mehrere Enzyme des 5 bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat zu verstärken.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang 10 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das 15 für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 • das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon
(US-A-4,278,765),
- 25 • das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-19 831 609),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231:332 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31:279-283 (1984)),
- 30 • die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158:647-653 (1986)),

- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0994190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1013765),
5 • das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Gene 27:193-199 (1984))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur
10 Abschwächung des pckA-Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),
15 • das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA (Accession Number AAC77180 des National Center for
20 Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und SEQ ID No. 5)
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und
25 SEQ ID No. 5)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Die Abschwächung des offenen Leserahmens yjfA und/oder des offenen Leserahmens ytfP wird bevorzugt.

30 Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die offenen Leserahmen yjfA und/oder ytfP unabhängig vom pckA-Gen

abzuschwächen, um zu einer Verbesserung der Aminosäuren, insbesondere der L-Threonin-Produktion zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß man folgende

5 Schritte durchführt:

- d) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest der offene Leserahmen yjfA und/oder ytfP abgeschwächt wird,
- 10 e) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- f) Isolieren des L-Threonins, wobei man gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder zum Teil zusammen mit der L-Aminosäure als festes Produkt isoliert.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen die offenen Leserahmen yjfA und ytfP von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden können, ist das Plasmid pMAK705ΔyjfA (Figur 2). Es enthält lediglich die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA und ytfP. Ein 337 bp langer Teil der ytfP-yjfA Region fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese der ytfP-yjfA Region einsetzbaren DNA 25 ist in SEQ ID No. 6 dargestellt.

Ein weiteres Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen die offenen Leserahmen yjfA und ytfP von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden können, ist das Plasmid pMAK705Δ90bp (Figur 5). Es enthält ebenfalls lediglich die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA und ytfP. Ein 90 bp langer Teil der ytfP-yjfA Region fehlt (Deletion). Die

Sequenz dieser für die Mutagenese der *ytfP-yjfA* Region einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 7 dargestellt.

Diese Deletionsmutation kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden. Es ist ebenfalls möglich, Mutationen in den offenen Leserahmen *yjfA* und/oder *ytfP* oder Mutationen, die die Expression dieser offenen Leserahmen betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7 dargestellte Form des Δ *ytfP*- und des Δ *yjfA*- Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur einzelnen oder gemeinsamen Abschwächung des *pckA*-Gens oder der offenen Leserahmen *yjfA* und/oder *ytfP* unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und

Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure,

5 Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt,

10 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

15 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.

20 Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

30 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur

eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird 5 normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et 10 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes 15 DH5 α /pMAK705 wurde am 12. September 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13720 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes 20 MG442 Δ pckA wurde am 02. Oktober 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13761 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes 25 B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40 wurde am 09. März 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 14150 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes 30 MG442 Δ 90yjfA wurde am 09. Mai 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 14289 hinterlegt.

Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die Abschwächung der offenen Leserahmen *ytfP* und *yjfA* einzeln vorzunehmen, um zu einer verbesserten Herstellung von L-Aminosäuren zu gelangen.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie z. B. L-Threonin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie
5 alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische
Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.
(Molecular cloning - A laboratory manual (1989) Cold Spring
Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation
von Escherichia coli wurde, wenn nicht anders beschrieben,
10 nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America USA (1989) 86:
2172-2175) durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen
und Transformanten war 37°C. Bei dem
15 Genaustauschverfahren nach Hamilton et.al. wurden
Temperaturen von 30°C und 44°C verwendet.

Beispiel 1

Konstruktion der Deletionsmutation des pckA-Gens

20 Teile der 5'- und 3'-Region des pckA-Gens wurden aus
Escherichia coli K12 unter Anwendung der Polymerase-
Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden
amplifiziert. Ausgehend von der Nukletidsequenz des pckA-
Gens in E. coli K12 MG1655 (SEQ ID No. 1) wurden folgende
25 PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg,
Deutschland):

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTAA - 3'

pckA'5'-2: 5' - GCATGCGCTCGGTCAAGGTAA - 3'

pckA'3'-1: 5' - AGGCCTGAAGATGGCACTATCG - 3'

30 pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 500 bp grosses DNA-Fragment aus der 5'-Region des pckA-Gens (mit pck1 bezeichnet) und ein ca. 600 bp grosses DNA-Fragment aus der 3'-Region des pckA-Gens (mit pck2 bezeichnet) konnte mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland) amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden den Herstellerangaben entsprechend jeweils mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgte auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war. Nach der Plasmid DNA Isolierung wurde der Vektor pCR2.1TOPOpck2 mit den Restriktionsenzymen StuI und XbaI gespalten und das pck2-Fragment nach der Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Der Vektor pCR2.1TOPOpck1 wurde nach der Plasmid DNA Isolierung mit den Enzymen EcoRV und XbaI gespalten und mit dem isolierten pck2-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war, selektioniert. Nach der Plasmid DNA Isolierung wurden durch die Kontrollspaltung mit den Enzymen SpeI und XbaI solche Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 3 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Eines der Plasmide wurde als pCR2.1TOPO Δ pckA bezeichnet.

Beispiel 2

Konstruktion des Austauschvektors pMAK705 Δ pckA

Das in Beispiel 1 beschriebene pckA-Allel wurde aus dem Vektor pCR2.1TOPO Δ pckA nach der Restriktion mit den Enzymen

SpeI und XbaI und Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit dem Enzym XbaI verdaut worden war, ligiert. Der 5 Ligationansatz wurde in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt war, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde nach Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen HpaI, KpnI, HindIII, SalI und 10 PstI nachgewiesen. Der entstandene Austauschvektor pMAK705 Δ pckA (= pMAK705deltapckA) ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

15 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli Stamm MG442

Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle

20 Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

Der Stamm MG442 weist eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure auf und besitzt eine gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin.

25 Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wurde MG442 mit dem Plasmid pMAK705 Δ pckA transformiert. Der Genaustausch erfolgte mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen

30 Selektionsverfahren und wurde durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Der erhaltene Stamm wurde als MG442ΔpckA bezeichnet.

Beispiel 4

5 Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442ΔpckA

MG442ΔpckA wurde auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung vermehrt: 3,5 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 1,5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar. Die Bildung von L-Threonin wurde in batch

10 Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten waren, überprüft. Dazu wurde 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄·7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 µl dieser Vorkultur wurden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,03 g/l FeSO₄·7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄·1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l 20 Glucose) überimpft und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

25 Anschließend wurde die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

30 In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442ΔpckA	5,4	3,7

xxxxxxxxxxxxxx ab hier 2. Innere Priorität xxxxxxxxxxxx

Beispiel 5

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm

5 MG442ΔpckA/pMW218gdhA

5.1 Amplifizierung und Klonierung des gdhA-Gens

Das Glutamat-Dehydrogenase-Gen aus Escherichia coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert.

10 Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das gdhA-Gen in E. coli K12 MG1655 (GenBank: Accession Nr. AE000270 und Nr. AE000271) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

Gdh1: 5' - TGAACACTTCTGGCGGTACG - 3'

15 Gdh2: 5' - CCTCGGCGAAGCTAATATGG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 2150 bp großes DNA-Fragment, das den gdhA-Kodierbereich und ca.

20 350 bp 5'-flankierende und ca. 450 bp 3'-flankierende Sequenzen umfaßt, kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird in das Plasmid pCR2.1TOPO kloniert und in den E. coli Stamm TOP10 transformiert (Invitrogen, Leek, Niederlande,

Produktbeschreibung TOPO TA Cloning Kit, Cat. No. K4500-01). Die erfolgreiche Klonierung wird durch Spaltung des Plasmids pCR2.1TOPOgdhA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und EcoRV nachgewiesen. Dazu wird die Plasmid DNA mittels 5 des „QIAprep Spin Plasmid Kits“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert und nach der Spaltung in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

5.2 Klonierung des gdhA-Gens in den Plasmidvektor pMW218

Das Plasmid pCR2.1TOPOgdhA wird mit dem Enzym EcoRI 10 gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und das 2,1 kbp große gdhA-Fragment mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Das Plasmid pMW218 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym EcoRI gespalten und mit 15 dem gdhA-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wird mit dem Ligationsansatz transformiert und pMW218 tragende Zellen durch Ausplattieren auf LB Agar (Lennox, Virology 1955, 1: 190), der mit 20 μ g/ml Kanamycin versetzt ist, selektioniert.

20 Die erfolgreiche Klonierung des gdhA-Gens kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit EcoRI und EcoRV nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pMW218gdhA (Figur 3) bezeichnet.

5.3 Herstellung des Stammes MG442 Δ pckA/pMW218gdhA

25 Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 Δ pckA und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW218gdhA transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 Δ pckA/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA.

30 5.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 Δ pckA/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das

Vorkulturmödium werden zusätzlich mit 20 µg/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

5

Tabelle 2

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442ΔpckA	5,4	3,7
MG442/pMW218gdhA	5,6	2,6
MG442ΔpckA/pMW218gdhA	5,5	4,0

Beispiel 6

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm
MG442ΔpckA/pMW219rhtC

10 6.1 Amplifizierung des rhtC-Gens

Das rhtC-Gen aus Escherichia coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das rhtC-Gen in E. coli K12 MG1655

15 (GenBank: Accession Nr. AE000458, Zakataeva et al. (FEBS Letters 452, 228-232 (1999)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

RhtC1: 5' - CTGTTAGCATCGGCGAGGCA - 3'

RhtC2: 5' - GCATGTTGATGGCGATGACG - 3'

20 Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 800

bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden.

6.2 Klonierung des rhtC-Gens in den Plasmidvektor pMW219

Das Plasmid pMW219 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym SmaI gespalten und mit dem rhtC-PCR-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wird mit dem Ligationsansatz transformiert und pMW219 tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit KpnI, HindIII und NcoI nachgewiesen werden. Das Plasmid pMW219rhtC ist in Figur 4 dargestellt.

6.3 Herstellung des Stammes MG442 Δ pckA/pMW219rhtC

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 Δ pckA und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW219rhtC transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 Δ pckA/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC.

6.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 Δ pckA/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das Vorkulturmöglichkeit werden zusätzlich mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442ΔpckA	5,4	3,7
MG442/pMW219rhtC	5,2	2,9
MG442ΔpckA/pMW219rhtC	4,8	4,4

Beispiel 7

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm B-3996kurΔtdhΔpckA/pVIC40

5 Der L-Threonin produzierende *E. coli* Stamm B-3996 ist in US-A- 5,175,107 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) hinterlegt.

Der Stamm B-3996 weist unter anderem eine Resistenz gegen 10 α-Amino-β-Hydroxyvaleriansäure auf, besitzt eine abgeschwächte, insbesondere ausgeschaltete, beziehungsweise defekte Threonindehydrogenase, besitzt eine verstärkte Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back resistenten Form, besitzt eine gegebenfalls partielle und 15 kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin und besitzt die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung.

7.1 Herstellung des Stammes B-3996kurΔtdhΔpckA/pVIC40

Von Stamm B-3996 wird nach Kultur im Antibiotika-freien Vollmedium für ungefähr zehn Generationen ein Derivat 20 isoliert, das das Plasmid pVIC40 nicht mehr enthält. Der entstandene Stamm ist Streptomycin-sensitiv und wird als B-3996kur bezeichnet.

Zum Einbau einer Deletion in das tdh-Gen wird die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology (1989) 171: 4617-

4622) beschriebene Methode eingesetzt, die auf der Verwendung des Plasmids pMAK705 mit einem temperatursensitiven Replikon beruht. Das Plasmid pDR121 (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology (1987) 169:4716-4721) enthält ein 3,7 Kilo-Basenpaare (kbp) großes DNA-Fragment aus *E. coli*, auf dem das tdh-Gen kodiert ist. Zur Erzeugung einer Deletion des tdh-Genbereiches wird pDR121 mit den Restriktionsenzymen Clal und EcoRV gespalten und das isolierte 5 kbp große DNA-Fragment nach Behandlung mit dem Klenow-Enzym ligiert. Der Ligationsansatz wird in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 μ g/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert.

Die erfolgreiche Deletion des tdh-Gens kann nach der Plasmid-DNA Isolierung und Kontrollspaltung mit EcoRI nachgewiesen werden. Das 1,7 kbp große EcoRI-Fragment wird isoliert und mit dem Plasmid pMAK705, das partiell mit EcoRI verdaut wird, ligiert. Der Ligationsansatz wird in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wird nach Plasmid-DNA Isolierung und Spaltung mit EcoRI nachgewiesen. Das entstandene pMAK705 Derivat wird als pDM32 bezeichnet.

Für den Genaustausch wird B-3996kur mit dem Plasmid pDM32 transformiert. Der Austausch des chromosomalen tdh-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt erfolgt mit dem von Hamilton et al. beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

Tdh1: 5'-TCGCGACCTATAAGTTGGG-3'

Tdh2: 5'-AATACCAGCCCTTGTTCGTG-3'.

Der entstandene Stamm wird auf Kanamycin-Sensitivität getestet und als B-3996kur Δ tdh bezeichnet.

Für die ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens wird B-3996kur Δ tdh mit dem in Beispiel 2 beschriebenen Austauschvektor pMAK705 Δ pckA transformiert. Der Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte

5 Deletionskonstrukt erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben. Der erhaltene Stamm wird als B-3996kur Δ tdh Δ pckA bezeichnet.

B-3996kur Δ tdh und B-3996kur Δ tdh Δ pckA werden mit dem aus B-3996 isolierten Plasmid pVIC40 transformiert und auf LB-Agar mit 20 µg/ml Streptomycin Plasmid tragende Zellen

10 selektioniert. Jeweils eine ausgewählte Einzelkolonie wird mit B-3996kur Δ tdh/pVIC40 und mit B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40 bezeichnet.

7.2 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme

15 B-3996kur Δ tdh/pVIC40 und B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40 wird wie im Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium, das Vorkulturmödium und das Produktionsmedium werden zusätzlich mit 20 µg/ml Streptomycin supplementiert.

In Tabelle 4 ist das Ergebnis des Versuches

20 zusammengefasst.

Tabelle 4

Stamm	OD (660)	L-Threonin g/l
B-3996kur Δ tdh/pVIC40	4,7	6,26
B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40	4,9	8,92

Beispiel 8

25 Herstellung von L-Lysin mit dem Stamm TOC21R Δ pckA

Der L-Lysin produzierende E. coli Stamm pDA1/TOC21R ist in der Patentanmeldung F-A-2511032 beschrieben und bei der Collection Nationale de Culture de Microorganisme (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Frankreich) unter der Nummer I-167 5 hinterlegt. Der Stamm und der plasmidfreie Wirt sind ebenfalls bei Dauce-Le Reverend et al. (European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 15:227-231 (1982)) unter der Bezeichnung TOCR21/pDA1 beschrieben.

8.1 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli
10 Stamm TOC21R

Von Stamm pDA1/TOC21R wird nach Kultur im Antibiotika-freien LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein Derivat isoliert, das das Plasmid pDA1 nicht mehr enthält. Der entstandene Stamm ist Tetracyclin-sensitiv und wird als 15 TOC21R bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird TOC21R mit dem Plasmid pMAK705ΔpckA (Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) 20 Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

25 pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Der erhaltene Stamm wird als TOC21RΔpckA bezeichnet.

8.2 Herstellung von L-Lysin mit dem Stamm TOC21RΔpckA

Die Bildung von L-Lysin durch die Stämme TOC21RΔ pckA und 30 TOC21R wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmildium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l

MgSO₄*7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l 5 (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄*1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose, 25 mg/l L-Isoleucin und 5 mg/l Thiamin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit 10 einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Lysin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik 15 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 5 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 5

Stamm	OD (660 nm)	L-Lysin g/l
TOC21R	1,0	1,14
TOC21RΔpckA	1,0	1,27

20 Beispiel 9

Herstellung von L-Isoleucin mit dem Stamm Stamm B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA/pVIC40

9.1 Herstellung des Stammes B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA/pVIC40

Der in Beispiel 7.1 erhaltene L-Isoleucin bedürftige Stamm 25 B-3996kurΔtdh wird unter Zuhilfenahme des Phagen Plkc (Lennox, Virology 1, 190-206 (1955); Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory 1972)

transduziert und L-Isoleucin prototrophe Transduktanten isoliert.

Hierzu wird der Phage Plkc auf dem Stamm MG1655 (Guyer et al., Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology 5 45, 135-140 (1981) und Blattner et al., Science 277, 1453-1462 (1997)) vermehrt und das Phagenlysat zur Transduktion des Stammes B-3996kurΔtdh eingesetzt. Die Multiplizität der Infektion beträgt ungefähr 0,2. Die Selektion auf L-Isoleucin prototrophe Transduktanten erfolgt auf Minimal-Agar, der 2 g/l Glucose und 10 mg/l L-Threonin enthält. Eine L-Isoleucin prototrophe Transduktante wird isoliert, zur Reinigung beziehungsweise Vereinzelung auf LB-Agar ausgestrichen und als B-3996kurΔtdhilvA⁺ bezeichnet.

Das pckA-Gen des Stammes B-3996kurΔtdhilvA⁺ wird anschliessend gegen das in Beispiel 1 und 2 hergestellte ΔpckA-Allel so wie in Beispiel 3 beschrieben ausgetauscht. Der erhaltene Stamm wird als B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA bezeichnet.

Die Stämme B-3996kurΔtdhilvA⁺ und B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA werden mit dem aus Stamm B-3996 isolierten Plasmid pVIC40 transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB-Agar, der mit 20 µg/ml Streptomycin supplementiert ist, selektioniert. Jeweils eine ausgewählte Einzelkolonie wird als B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA/pVIC40 und B-25 3996kurΔtdhilvA⁺/pVIC40 bezeichnet.

9.2 Herstellung von L-Isoleucin

Die Herstellung von L-Isoleucin durch die Stämme B-3996kurΔtdhilvA⁺/pVIC40 und B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA/pVIC40 wird unter den Versuchsbedingungen, wie in Beispiel 4 beschrieben, geprüft. Das Minimalmedium, das Vorkulturmöglichkeit und das Produktionsmedium werden zusätzlich mit 20 µg/ml Streptomycin supplementiert.

In Tabelle 6 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 6

Stamm	OD (660)	L-Isoleucin mg/l
B-3996kurΔtdhilvA ⁺ /pVIC40	5,8	57
B-3996kurΔtdhilvA ⁺ ΔpckA/pVIC40	5,7	70

Beispiel 10

Herstellung von L-Valin mit dem Stamm B-12288ΔpckA

Der L-Valin produzierende E. coli Stamm AJ 11502 ist in der 5 Patentschrift US-A-4391907 beschrieben und bei dem National Center for Agricultural Utilization Research (Peoria, Illinois, USA) als NRRL B-12288 hinterlegt.

10.1 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli Stamm B-12288

10 Von Stamm AJ 11502 wird nach Kultur im Antibiotika-freien LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein plasmidfreies Derivat isoliert. Der entstandene Stamm ist Ampicillin-sensitiv und wird als AJ11502kur bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das 15 Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird AJ11502kur mit dem Plasmid pMAK705ΔpckA (Siehe Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden 20 (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTAA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

25 Der erhaltene Stamm wird als AJ11502kurΔpckA bezeichnet. Aus Stamm NRRL B-12288 wird das in der Patentschrift US-A-

4391907 beschriebene Plasmid isoliert, welches die genetische Information bezüglich der Valin-Produktion trägt. Der Stamm AJ11502kur Δ pckA wird mit diesem Plasmid transformiert. Eine der erhaltenen Transformanten wird als 5 B-12288 Δ pckA bezeichnet.

10.2 Herstellung von L-Valin mit dem Stamm B-12288 Δ pckA

Die Bildung von L-Valin durch die Stämme B-12288 Δ pckA und NRRL B-12288 wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose und 50 mg/l Ampicillin beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, 15 Schweiz) inkubiert. 250 μl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 5 mg/l Thiamin und 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C 20 inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Valin 25 im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 7 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Stamm	OD (660 nm)	L-Valin g/l
NRRL B-12288	5,6	0,93

B-12288ΔpckA	5,5	1,12
--------------	-----	------

Beispiel 11

Konstruktion von Deletionsmutationen der ytfP-yjfA Genregion

- 5 Die ytfP-yjfA Genregion wird aus Escherichia coli K12 unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz der ytfP-yjfA Genregion in E. coli K12 MG1655 (SEQ ID No. 5) werden folgende PCR-Primer
- 10 synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

ytfP-1: 5' - GGCGATGTCGCAACAAGCTG - 3'

ytfP-2: 5' - CTGTTCATGGCCGCTTGCTG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 1300 bp grosses DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland) amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird den Herstellerangaben entsprechend mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgt auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist. Nach der Plasmid DNA Isolierung wird die erfolgreiche Klonierung des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NsiI überprüft.

Zur Erzeugung einer 337 bp Deletion in der ytfP-yjfA Region 30 wird der Vektor pCR2.1TOPOytfP-yjfA mit den Restriktionsenzymen NdeI und SspI gespalten und das 4,8 kbp

große DNA-Fragment nach Behandlung mit dem Klenow-Enzym ligiert.

Zur Erzeugung einer 90 bp Deletion wird der Vektor pCR2.1TOPOytfP-yjfA mit den Enzymen NdeI und SphI gespalten

5 und das 5 kbp große DNA-Fragment nach Behandlung mit dem Klenow-Enzym ligiert.

Der E. coli Stamm DH5 α wird mit den Ligationsansätzen transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 μ g/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Nach 10 der Plasmid DNA Isolierung werden durch die Kontrollspaltung mit den Enzym EcoRI solche Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 6 und die in SEQ ID No. 7 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Die Plasmide werden als pCR2.1TOPO Δ yjfA und 15 pCR2.1TOPO Δ 90bp bezeichnet.

Beispiel 12

Konstruktion der Austauschvektoren pMAK705 Δ yjfA und pMAK705 Δ 90bp

20 Die in Beispiel 11 beschriebenen ytfP-yjfA Allele werden aus den Vektoren pCR2.1TOPO Δ yjfA und pCR2.1TOPO Δ 90bp nach der Restriktion mit den Enzymen SacI und XbaI und Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of 25 Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit den Enzymen SacI und XbaI verdaut wird, ligiert. Die Ligationsansätze werden in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wird nach 30 Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen SacI und XbaI nachgewiesen. Die entstandenen Austauschvektoren pMAK705 Δ yjfA (= pMAK705deltayjfA) und pMAK705 Δ 90bp (= pMAK705delta90bp) sind in Figur 2 und in Figur 5 dargestellt.

Beispiel 13

Ortsspezifische Mutagenese der *ytfP-yjfA* Genregion in dem *E. coli* Stamm MG442

5 Für den Austausch der chromosomalen *ytfP-yjfA* Genregion gegen das Plasmid-kodierte 90 bp Deletionskonstrukt wird MG442 mit dem Plasmid pMAK705Δ90bp transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 171, 4617 - 4622) beschriebenen

10 Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

ytfP-1: 5' - GGCGATGTCGAAACAAGCTG - 3'

15 *ytfP-2*: 5' - CTGTTCATGGCCGCTTGCTG - 3'

Der erhaltene Stamm wird als MG442Δ90yjfA bezeichnet.

Beispiel 14

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442Δ90yjfA

20 Die Herstellung von L-Threonin durch den Stamm MG442Δ90yjfA wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. In Tabelle 8 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

Tabelle 8

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5

MG442Δ90yjfA	5,7	2,1
--------------	-----	-----

Beispiel 14

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442Δ90yjfAΔpckA

14.1 Herstellung des Stammes MG442Δ90yjfAΔpckA

5 Das pckA-Gen des Stammes MG442Δ90yjfA wird wie in Beispiel 3 beschrieben gegen das ΔpckA-Allel (Siehe Beispiel 1 und 2) ausgetauscht. Der erhaltene Stamm wird als MG442Δ90yjfAΔpckA bezeichnet.

14.2 Herstellung von L-Threonin

10 Die Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442Δ90yjfAΔpckA erfolgt wie in Beispiel 4 beschrieben. Das Ergebnis ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442Δ90yjfA	5,7	2,1
MG442Δ90yjfAΔpckA	5,3	3,9

Folgende Figuren sind beigelegt:

- Figur 1: pMAK705 Δ pckA (= pMAK705deltapckA)
- Figur 2: pMAK705 Δ yjfA (= pMAK705deltayjfA)
- Figur 3: pMW218gdhA
- 5 • Figur 4: pMW219rhtC
- Figur 5: pMAK705 Δ 90bp (= pMAK705delta90bp)

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- 10 • cat: Chloramphenicolresistenzgen
- rep-ts: temperatursensitive Replikationsregion des Plasmides pSC101
- pck1: Teil der 5'-Region des pckA-Gens
- pck2: Teil der 3'-Region des pckA-Gens
- 15 • ytfP'-yjfA': DNA-Sequenz enthaltend trunkierte Kodierregionen von ytfP und yjfA
- kan: Kanamycinresistenzgen
- gdhA: Glutamat-Dehydrogenase-Gen
- rhtC: Threoninresistenz vermittelndes Gen

20

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens*
- 25 • BglII: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus globigii*
- ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryphanon latum*

- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae*
- 5 • KpnI: Restriktionsendonuklease aus *Klebsiella pneumoniae*
- PstI: Restriktionsendonuklease aus *Providencia stuartii*
- PvuI: Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris*
- 10 • SacI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces achromogenes*
- SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
- SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*
- 15 • XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
- XhoI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas holcicola*

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae.

10 <130> 000425 BT

<140>

<141>

<160> 19

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1622

20 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)...(1620)

<223> pckA

<400> 1

30	atg cgc gtt aac aat ggt ttg acc ccg caa gaa ctc gag gct tat ggt	48
	Met Arg Val Asn Asn Gly Leu Thr Pro Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Gly	
	1 5 10 15	

35	atc agt gac gta cat gat atc gtt tac aac cca agc tac gac ctg ctg	96
	Ile Ser Asp Val His Asp Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Asp Leu Leu	
	20 25 30	

40	tat cag gaa gag ctc gat ccg agc ctg aca ggt tat gag cgc ggg gtg	144
	Tyr Gln Glu Leu Asp Pro Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Gly Val	
	35 40 45	

45	tta act aat ctg ggt gcc gtt gcc gtc gat acc ggg atc ttc acc ggt	192
	Leu Thr Asn Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly	
	50 55 60	

50	cgt tca cca aaa gat aag tat atc gtc cgt gac gat acc act cgc gat	240
	Arg Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Arg Asp Asp Thr Thr Arg Asp	
	65 70 75 80	

55	act ttc tgg tgg gca gac aaa ggc aaa ggt aag aac gac aac aaa cct	288
	Thr Phe Trp Trp Ala Asp Lys Gly Lys Lys Asn Asp Asn Lys Pro	
	85 90 95	

60	ctc tct ccg gaa acc tgg cag cat ctg aaa ggc ctg gtg acc agg cag	336
	Leu Ser Pro Glu Thr Trp Gln His Leu Lys Gly Leu Val Thr Arg Gln	
	100 105 110	

65	ctt tcc ggc aaa cgt ctg ttc gtt gtc gac gct ttc tgt ggt gcg aac	384
	Leu Ser Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn	
	115 120 125	

70	ccg gat act cgt ctt tcc gtc cgt ttc atc acc gaa gtg gcc tgg cag	432
	Pro Asp Thr Arg Leu Ser Val Arg Phe Ile Thr Glu Val Ala Trp Gln	
	130 135 140	

75	gcg cat ttt gtc aaa aac atg ttt att cgc ccg agc gat gaa gaa ctg	480
	Ala His Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Ser Asp Glu Glu Leu	

145	150	155	160		
gca ggt ttc aaa cca gac ttt atc gtt atg aac ggc gcg aag tgc act Ala Gly Phe Lys Pro Asp Phe Ile Val Met Asn Gly Ala Lys Cys Thr 165 170 175				528	
aac ccg cag tgg aaa gaa cag ggt ctc aac tcc gaa aac ttc gtg gcg Asn Pro Gln Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala 180 185 190				576	
10	ttt aac ctg acc gag cgc atg cag ctg att ggc ggc acc tgg tac ggc Phe Asn Leu Thr Glu Arg Met Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly 195 200 205				624
15	ggc gaa atg aag aaa ggg atg ttc tcg atg atg aac tac ctg ctg ccg Gly Glu Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Leu Leu Pro 210 215 220				672
20	ctg aaa ggt atc gct tct atg cac tgc tcc gcc aac gtt ggt gag aaa Leu Lys Gly Ile Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Glu Lys 225 230 235 240				720
25	ggc gat gtt gcg gtg ttc ttc ggc ctt tcc ggc acc ggt aaa acc acc Gly Asp Val Ala Val Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr 245 250 255				768
30	ctt tcc acc gac ccg aaa cgt cgc ctg att ggc gat gac gaa cac ggc Leu Ser Thr Asp Pro Lys Arg Arg Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly 260 265 270				816
35	tgg gac gat gac ggc gtg ttt aac ttc gaa ggc ggc tgc tac gca aaa Trp Asp Asp Asp Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys 275 280 285				864
40	act atc aag ctg tcg aaa gaa gcg gaa cct gaa atc tac aac gct atc Thr Ile Lys Leu Ser Lys Glu Ala Glu Pro Glu Ile Tyr Asn Ala Ile 290 295 300				912
45	cgt cgt gat gcg ttg ctg gaa aac gtc acc gtg cgt gaa gat ggc act Arg Arg Asp Ala Leu Leu Glu Asn Val Thr Val Arg Glu Asp Gly Thr 305 310 315 320				960
50	atc gac ttt gat gat ggt tca aaa acc gag aac acc cgc gtt tct tat Ile Asp Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr 325 330 335				1008
55	ccg atc tat cac atc gat aac att gtt aag ccg gtt tcc aaa gcg ggc Pro Ile Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Lys Pro Val Ser Lys Ala Gly 340 345 350				1056
60	cac gcg act aag gtt atc ttc ctg act gct gat gct ttc ggc gtg ttg His Ala Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu 355 360 365				1104
65	ccg ccg gtt tct cgc ctg act gcc gat caa acc cag tat cac ttc ctc Pro Pro Val Ser Arg Leu Thr Ala Asp Gln Thr Gln Tyr His Phe Leu 370 375 380				1152
65	tct ggc ttc acc gcc aaa ctg gcc ggt act gag cgt ggc atc acc gaa Ser Gly Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Ile Thr Glu 385 390 395 400				1200
65	ccg acg cca acc ttc tcc gct tgc ttc ggc gcg gca ttc ctg tcg ctg Pro Thr Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu 405 410 415				1248

cac ccg act cag tac gca gaa gtg ctg gtg aaa cgt atg cag gcg gcg His Pro Thr Gln Tyr Ala Glu Val Leu Val Lys Arg Met Gln Ala Ala 420 425 430	1296
5 ggc gcg cag gct tat ctg gtt aac act ggc tgg aac ggc act ggc aaa Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys 435 440 445	1344
10 cgt atc tcg att aaa gat acc cgc gcc att atc gac gcc atc ctc aac Arg Ile Ser Ile Lys Asp Thr Arg Ala Ile Ile Asp Ala Ile Leu Asn 450 455 460	1392
15 ggt tcg ctg gat aat gca gaa acc ttc act ctg ccg atg ttt aac ctg Gly Ser Leu Asp Asn Ala Glu Thr Phe Thr Leu Pro Met Phe Asn Leu 465 470 475 480	1440
20 gcg atc cca acc gaa ctg ccg ggc gta gac acg aag att ctc gat ccg Ala Ile Pro Thr Glu Leu Pro Gly Val Asp Thr Lys Ile Leu Asp Pro 485 490 495	1488
25 cgt aac acc tac gct tct ccg gaa cag tgg cag gaa aaa gcc gaa acc Arg Asn Thr Tyr Ala Ser Pro Glu Gln Trp Gln Glu Lys Ala Glu Thr 500 505 510	1536
30 gcg ggt gcc gcg ctg gta gcg gct ggt ccg aaa ctg taa Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Leu 530 535 540	1623
35 <210> 2 <211> 540 <212> PRT <213> Escherichia coli	
40 <400> 2 Met Arg Val Asn Asn Gly Leu Thr Pro Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Gly 1 5 10 15	
45 Ile Ser Asp Val His Asp Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Asp Leu Leu 20 25 30	
50 Tyr Gln Glu Glu Leu Asp Pro Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Gly Val 35 40 45	
55 Leu Thr Asn Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly 50 55 60	
60 Arg Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Arg Asp Asp Thr Thr Arg Asp 65 70 75 80	
65 Thr Phe Trp Trp Ala Asp Lys Gly Lys Asn Asp Asn Lys Pro 85 90 95	
70 Leu Ser Pro Glu Thr Trp Gln His Leu Lys Gly Leu Val Thr Arg Gln 100 105 110	
75 Leu Ser Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn 115 120 125	
80 Pro Asp Thr Arg Leu Ser Val Arg Phe Ile Thr Glu Val Ala Trp Gln 130 135 140	

Ala His Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Ser Asp Glu Glu Leu
 145 150 155 160

5 Ala Gly Phe Lys Pro Asp Phe Ile Val Met Asn Gly Ala Lys Cys Thr
 165 170 175

Asn Pro Gln Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala
 180 185 190

10 Phe Asn Leu Thr Glu Arg Met Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly
 195 200 205

Gly Glu Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Leu Leu Pro
 210 215 220

15 Leu Lys Gly Ile Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Glu Lys
 225 230 235 240

20 Gly Asp Val Ala Val Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr
 245 250 255

Leu Ser Thr Asp Pro Lys Arg Arg Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly
 260 265 270

25 Trp Asp Asp Asp Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys
 275 280 285

Thr Ile Lys Leu Ser Lys Glu Ala Glu Pro Glu Ile Tyr Asn Ala Ile
 290 295 300

30 Arg Arg Asp Ala Leu Leu Glu Asn Val Thr Val Arg Glu Asp Gly Thr
 305 310 315 320

35 Ile Asp Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr
 325 330 335

Pro Ile Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Lys Pro Val Ser Lys Ala Gly
 340 345 350

40 His Ala Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu
 355 360 365

Pro Pro Val Ser Arg Leu Thr Ala Asp Gln Thr Gln Tyr His Phe Leu
 370 375 380

45 Ser Gly Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Ile Thr Glu
 385 390 395 400

50 Pro Thr Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu
 405 410 415

His Pro Thr Gln Tyr Ala Glu Val Leu Val Lys Arg Met Gln Ala Ala
 420 425 430

55 Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys
 435 440 445

Arg Ile Ser Ile Lys Asp Thr Arg Ala Ile Ile Asp Ala Ile Leu Asn
 450 455 460

60 Gly Ser Leu Asp Asn Ala Glu Thr Phe Thr Leu Pro Met Phe Asn Leu
 465 470 475 480

65 Ala Ile Pro Thr Glu Leu Pro Gly Val Asp Thr Lys Ile Leu Asp Pro
 485 490 495

Arg Asn Thr Tyr Ala Ser Pro Glu Gln Trp Gln Glu Lys Ala Glu Thr
 500 505 510
 Leu Ala Lys Leu Phe Ile Asp Asn Phe Asp Lys Tyr Thr Asp Thr Pro
 5 515 520 525
 Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Leu
 530 535 540

10

<210> 3
 <211> 1156
 <212> DNA
 15 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(1156)
 20 <223> Mutagene DNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(35)
 25 <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)...(522)
 30 <223> Teil der 5'-Region (pck1) des pckA-Gens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (523)...(542)
 35 <223> Technische DNA/Reste Polylinker Sequenz

<220>
 <221> misc feature
 <222> (543)...(1105)
 40 <223> Teil der 3'-Region (pck2) des pckA-Gens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1106)...(1156)
 45 <223> Technische DNA/Reste Polylinker Sequenz

<400> 3
 ctagtaacgg ccgcccagtgt gctggaattc ggcttgatcc gagcctgaca ggttatgagc 60
 gcgggggttt aactaatctg ggtgccgtt ccgtcgatac cgggatcttc accggctgtt 120
 50 caccaaaaaga taagtatatac gtccgtgacg ataccactcg cgatactttc tggggggcag 180
 acaaaggcaa aggtaaagaac gacaacaaac ctctctctcc gggaaacctgg cagcatctga 240
 aaggcctggt gaccaggcag cttccggca aacgtctgtt ctttgtcgcac gctttctgtg 300
 gtgcgaaccc ggatactcgt cttccgtcc gtttcatcac cgaagtggcc tggcaggcgc 360
 attttgtcaa aaacatgttt attcgccccga gcgatgaaaga actggcaggt ttcaaaccag 420
 55 actttatcgt tatgaacggc gcgaaagtgc ctaaccgcga gtggaaagaa cagggtctca 480
 actccgaaaaa cttcgtggcg tttaacctga ccgagcgcatt gcaagccgaa ttctgcagat 540
 cctgaagatg gcacatctga ctttgcgtat gttcaaaaaa ccgagaacac ccgcgtttct 600
 tatccgatct atcacatcgta taacattgtt aagccgggtt ccaaageggg ccacgcgact 660
 aaggttatct tcctgactgc tgatgctttc ggcgtgttgc cggccgtttc tcgcctgact 720
 60 gccgatcaaa cccagttatca cttccctctct ggcttccaccc ccaaactggc cggtaactgag 780
 cgtggcatca ccgaacccgac gccaaccccttc tccgcttgc tccggcggc attcctgtcg 840
 ctgcacccga ctcagtcgc agaagtgcgt gtgaaacgtt tgcaggcggc gggcgcgcag 900
 gcttatctgg ttaacactgg ctggAACGGC actggcaaac gtatctcgat taaagatacc 960
 65 cgcgccatca tcgacgcccatt cctcaacgggt tcgctggata atgcagaaac cttcactctg 1020
 ccgatgttta acctggcgat cccaaaccgaa ctggccggcg tagacacgaa gattctcgat 1080
 cccgctaaca cctacgttcc tccggaaagcc gaattctgca gatatccatc acactggcg 1140

ccgctcgagc atgcata

1156

5 <210> 4
 <211> 1294
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Startkodon des delta pckA-Allels

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(598)
 <223> 5'-Region des delta pckA-Allels

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (599)..(618)
 <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (619)..(1291)
 <223> 3'-Region des delta pckA-Allels

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1292)..(1294)
 <223> Stopkodon des delta pckA-Allels

35 <400> 4
 atgcgcgtta acaatggttt gaccccga aactcgagg cttatggat cagtgacgta 60
 catgatatcg tttacaaccc aagctacgac ctgctgtatc aggaagagct cgatccgagc 120
 ctgacagggtt atgagcgcgg ggtgttaact aatctgggtc cgcgttgcgt cgataccggg 180
 atcttcaccg gtcgttccacc aaaagataag tatatcgatc gtgacgatac cactcgcgat 240
 actttctggt gggcagacaa aggcaaaaggta aagaacgaca acaaaccctt ctctccggaa 300
 40 acctggcagc atctgaaagg cctggtgacc aggcagctt cggccaaacg tctgttcgtt 360
 gtcgacgctt tctgtgggtc gaacccggat actcgcttt cgttgcgtt catcaccgaa 420
 gtggcctggc aggcgcat ttgtcaaaaac atgtttattc gcccggcgta tgaagaactg 480
 gcagggttca aaccagactt tatcgttatg aacggcgcga agtgcactaa cccgcagtgg 540
 aaagaacagg gtctcaactc cgaaaacttc gtggcggtt acctgaccga ggcgcattgaa 600
 45 gccaattctt gcagatctt aagatggcac tatcgactt gatgtgggtt caaaaaccgaa 660
 gaacacccgc gtttcttacatcgatctatca catcgataac attgttaagc cggttccaa 720
 agcggggccac gcgactaagg ttatcttcct gactgctgtatc gtttgcggc tggttgcggc 780
 ggtttctcgc ctgactgccc atcaaaccctt gtatcactt ctctctgggt tcaccggcaa 840
 actggccgggt actgagcggt gcatcaccga accgacgcca accttctccg cttgttcgg 900
 50 cgccggattt ctgtcgctgc acccgactca gtacgcagaa gtgtcggtga aacgtatgca 960
 ggcggccggc gcgccaggctt atctggttaa cactggctgg aacggcactg gcaaacgttat 1020
 ctcgattttttt gatacccgcc ccattatcgatcgatccctt aacgggttcgc tggataatgc 1080
 agaaaaccttc actctgcccgt tggttaacctt ggcgatccca accgaaactgc cgggcgtaga 1140
 cacgaagatt ctgcgatccgc gtaacaccta cgcttctccg gaacagtggc agaaaaaaagc 1200
 55 cgaaaaccttgc gcgaaactgtt atatcgacaa ctgcgatccaa tacaccgaca cccctgcggg 1260
 tgccgcgtt gtagcggtt gtccgaaactt gtaa 1294

60 <210> 5
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

65 <220>
 <221> gene
 <222> (376)..(714)

<223> ORF ytfP
 <220>
 <221> gene
 5 <222> Complement((461)..(727))
 <223> ORF yjfA
 <400> 5
 10 ggcgatgtcg caacaagctg ctttgtctta tttgtacgt ggacaaggcc tggagagcga 60
 tcagagcgac agtgcggcaa tgacctcgat gctgatttgt ttgggggttg cgcaaagtgg 120
 ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacgt tggcgtaaagc aatttagcgc tcgacaccca 180
 gggagtaggc gactcctccc agtagtgtt cagcggctat gtattgccag gtctgcaagt 240
 gaaatacggc gtgggtatata ttgactctat agcaaacactc acgttacgtt atcgcctgat 300
 gcctaagcta tatcttggaa ccgtgtctgg ttagaccag gcaactggatt tgctctatca 360
 15 gttcgagtt tagcaatgcg aatatttgc tacggcagtt tacggccacaa acaaggcaac 420
 agtcactgga tgaccaatgc ccagttactg ggcgatttca gtatcgataa ctaccagttg 480
 tatacgctgg gccactatcc aggccgagtt ccggggaaacg gaacggtaca cggtaagtt 540
 tatcgattt acaacccac gctggccgaa ctgtatgcct tgccgaccag gggcggtgaa 600
 tacgcgcgc agttgattca gacgcccgtac gggagtgcat ggatgtacgt ttatcaacga 660
 20 cccgtcgatg gattaaagct aatttggaaagc ggcgacttgt tagacaggga taagtaacca 720
 tatgcatacg ccacccctcggtt gttttcgag acgactcgca ttctgtttt 780
 taattccctc acctttgtctt ttctctccg agccgctttc catatctatt aaccataaaa 840
 aaactctgtc ggcatttccaa aatgcgcagg ggtaaaacgt ttccctgttagc accgtgagtt 900
 atactttgtt taacttaagg aggtgcagat ggcgttacc ataaaaagat gggggaaacag 960
 25 tgcaggatgt gtcatttccaa atatcgtaat gaaagaactt aacttacgc cggggcagag 1020
 cgtggaggcg caagtggacca acaatcaact gatttgcaca cccatctcca ggcgctactc 1080
 gcttggatgaa ctgctggcac agtgtgacat gaaacggccg gaaacttagcg agcaggatgt 1140
 ctggggtaaa tccaccctcg cgggtgacga aatatggtaa agaaaatgtg atttgaacgg 1200
 ggagacattt gtcgttttgg ctgtatcca gcaagcggcc atgaacag 1248
 30
 <210> 6
 <211> 911
 <212> DNA
 35 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(911)
 40 <223> Deletion tragende ytfP-yjfA Region
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(383)
 45 <223> 5'-Flanke der ytfP-yjfA Region
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (384)..(911)
 50 <223> 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (376)..(378)
 55 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF ytfP
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> Complement((388)..(390))
 60 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF yjfA
 <400> 6
 ggcgatgtcg caacaagctg ctttgtctta tttgtacgt ggacaaggcc tggagagcga 60
 tcagagcgac agtgcggcaa tgacctcgat gctgatttgt ttgggggttg cgcaaagtgg 120
 65 ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacgtt tggcgtaaagc aatttagcgc tcgacaccca 180
 gggagtaggc gactcctccc agtagtgtt cagcggctat gtattgccag gtctgcaagt 240

gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaacactc acgttacgtt atccgcctgat 300
 gcctaagcta tatctggaaag ccgtgtctgg ttagaccagg gcactggatt tgctctatca 360
 gttcgagtt tagcaatgcg aattatgcatt acgccaccc cgggtggcg tgggtttgc 420
 5 gagacgactc gcattctgtt ttgttaattcc ctcacccctt gctttctct ccgagccgct 480
 ttccatatct attaacgcatt aaaaaactct gctggcattc acaaatgcgc agggtaaaa 540
 cgttcctgt agcacccgtga ttataacttt gtataactta aggagggtca gatgcgtatt 600
 accataaaaa gatgggggaa cagtgcaggat atggcattt ccaatatcgat aatgaaagaa 660
 cttaacttac agccggggca gacgtggaa ggcgaatgtga gcaacaatca actgattctg 720
 10 acaccatct ccaggcgctt ctcgccttgat gaactgctgg cacagtgtga catgaacgcc 780
 gcggaactt a gcgagcagga tgcgtgggtt aaatccaccc ctgcgggtga cgaatatgg 840
 taaagaaaaa tgaatttggaa cggggagaca ttgtgttgtt tggctttgat ccagcaagcg 900
 gccatgaaca g 911

15 <210> 7
 <211> 1158
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1158)
 <223> Deletion tragende ytfP-yjfA Region

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(630)
 <223> 5'-Flanke der ytfP-yjfA Region

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (631)..(1158)
 <223> 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (376)..(378)
 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF ytfP

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> Complement((635)..(637))
 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF yjfA

45 <400> 7
 ggcgtatgtcg caacaagctg ccttgcctta tttgtacgt ggacaaggcc tggagagcga 60
 tcagagcgac agtgcggcaa tgacctcgat gctgatttgtt tgggggttg cgcaaaatgg 120
 ccagattgtg gttaaaatcg gcgagacgtt tggcgtaagc aatttagcgc tcgacaccca 180
 gggagtaggc gactcctccc aggtatgtgtt cagcggctat gtattgcac gtctgcaagt 240
 50 gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaacactc acgttacgtt atccgcctgat 300
 gcctaagcta tatctggaaag ccgtgtctgg ttagaccagg gcactggatt tgctctatca 360
 gttcgagtt tagcaatgcg aatatttgc ttcggcgtt tacgcccacaa acaaggcaac 420
 agtcacttgc tgaccaatgc ccagttactg ggcgatttca gtatcgataa ctaccagtt 480
 tatacgctgg gccactatcc aggcgcgtt ccggggaaacg gaacggtaca cggtaagtt 540
 55 ttcgtatgg acaacggcac gctggccgaa cttgtatgcct tgccgacccag gggcggtgaa 600
 tacgcgcgc agttgttca gacggcgatc tatgcatacg ccacccctgg gtggcggtgt 660
 ttttgcgag acgtactcgat ttctgttttgc taattccctc accttttgc tttctctccg 720
 agccgcgttc catacttatt aacgcataaa aaactctgtt ggcattcaca aatgcgcagg 780
 ggtaaaacgt ttcctgttagc accgtgagtt atactttgtt taacttaagg aggtgcagat 840
 60 gcttattacc ataaaaagat gggggaaacag tgcaggtatg gtcattccca atatcgtaat 900
 gaaagaacctt aacttacagc cggggcagag cgtggaggcg caagtgagca acaatcaact 960
 gattctgaca cccatcttca ggcgtactc gcttgcgttca ctgctggcac agtgtgacat 1020
 gaacgcgcgc gaaacttagcg agcaggatgtt ctgggttaaa tccacccctg cgggtgacga 1080
 aatatggtaa agaaaagtga atttgcacgg ggagacatttgc tgctgggttgg ctttgcataa 1140
 65 gcaagcggcc atgaacacag 1158

5 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pckA'5'-1
<400> 8
gatccgagcc tgacagggtta 20

15 <210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pckA'5'-2
<400> 9
25 gcatgcgcgc ggtcagggtta 20

30 <210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pckA'3'-1
<400> 10
aggcctgaag atggcactat cg 22

40 <210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pckA'3'-2
50 <400> 11
ccggagaagc gtaggttta 20

55 <210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
60 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Gdh1
<400> 12
tgaacacttc tggcggtacg 20

65 <210> 13

<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Gdh2

<400> 13
cctcggcgaa gctaataatgg

10 <210> 14
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer RhtC1

20 <400> 14
ctgttagcat cggcgaggca

25 <210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer RhtC2

<400> 15
gcatgttcat ggcgatgacg

35 <210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Tdh1

<400> 16
45 tcgcgaccta taagtttggg

50 <210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Tdh2

<400> 17
aataccagcc cttgttcgtg

60 <210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

65 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

ytfP-1
<400> 18
ggcgatgtcg caacaagctg 20
5
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
10 <213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
ytfP-2
15 <400> 19
ctgttcatgg ccgcatttgctg 20
20

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
5 daß man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae, in denen man zumindest das pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
10 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
15 c) Isolieren der L-Aminosäure, wobei man gegebenenfalls Bestandteile Fermentationsbrühe und die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder zum Teil zusammen mit der L-Aminosäure als festes Produkt
20 isoliert.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der
25 gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
30 sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),
35 das (die) für das pckA-Gen kodiert (kodieren)
abschwächt, insbesondere ausschaltet.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1,
durch gekennzeichnet,
daß man die regulatorischen und/oder katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein)
verringert, für das das Polynukleotid pckA kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1,
durch gekennzeichnet,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren
Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae
10 fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
 - 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-
Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
15 Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
 - 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-
Gen,
 - 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende
pps-Gen,
 - 20 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
kodierende ppc-Gen,
 - 6.5 die für die Transhydrogenase kodierende Gene pntA
und pntB,
 - 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
 - 25 6.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC, und
 - 6.8 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende
gdhA-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1,
30 durch gekennzeichnet,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren

Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-
5 Gen,

7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-
Gen,

7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,

7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
10

abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

8. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:
15

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest den offenen Leserahmen yjfA und/oder ytfP oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
20

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
25

c) Isolieren der L-Aminosäure, wobei man gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und die Biomasse 30 in ihre Gesamtheit oder zum Teil zusammen mit der L-Aminosäure als festes Produkt isoliert.

9. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß man L-Isoleucin, L-Valin, L-Lysin oder L-Threonin herstellt.

10. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens das pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet sind.

5 11. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 10, die zusätzlich ein oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, eine verstärkte Homoserin-
10 Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back resistenten Form, eine gegebenenfalls kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin, eine abgeschwächte Threonindehydrogenase und die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung besitzen.

15 12. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae in denen mindestens der offene Leserahmen yjfA und/oder ytfP oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet sind.

20 13. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 12, die zusätzlich ein oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, eine verstärkte Homoserin-
25 Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back resistenten Form, eine gegebenenfalls kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin, eine abgeschwächte Threonindehydrogenase und die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung besitzen.

30 14. Plasmid pMAK705 Δ pckA, das Teile der 5'-und der 3'-Region des pckA-Gens, entsprechend SEQ ID No. 3, enthält, dargestellt in Figur 1.

35 15. Plasmid pMAK705 Δ yjfA, das die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der

offenen Leserahmen yjfA- und des ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6 enthält, dargestellt in Figur 2.

16. Plasmid pMAK705Δ90bp, das die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA- und des ytfP, entsprechend SEQ ID No. 7 enthält, dargestellt in Figur 5.

17. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae, enthaltend eine für die 5'- und 3'-Region des pckA-Gens kodierende Polynukleotidsequenz dargestellt in SEQ ID No. 4 insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenase des pckA-Gens

18. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae, enthaltend die 5'- und 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region, dargestellt in SEQ ID No. 6, insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenese des offenen Leserahmens ytfP und/oder yjfA.

19. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Deletionsmutation im pckA-Gen entsprechend SEQ ID No. 4.

20. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7

21. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen yjfA, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7

30 22. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 19, zusätzlich enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7

23. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 19, zusätzlich enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen yjfA, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7.

5 24. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae gemäß den Ansprüchen 19, 20 oder 21, durch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, eine verstärkte Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back resistenten Form, eine gegebenenfalls kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin, eine abgeschwächte Threonindehydrogenase und die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung besitzen

10 25. Eschericia coli K-12 Stamm MG442 Δ pckA, hinterlegt unter der Nummer DSM 13761 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen.

20 26. Escherichia coli K-12 Stamm MG442 Δ 90yjfA, hinterlegt unter der Nummer DSM 14289 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen.

27. Escherichia coli K-12 Stamm B3996kur Δ tdhpckA/pVIC40, hinterlegt unter der Nummer DSM 14150 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen.

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Zusammenfassung

- 5 Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, durch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:
- 10 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae, in denen man zumindest das pckA-Gen und/oder die offenen Leserahmen yifA und ytfP einzeln oder gemeinsam abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- 15 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
- 20 c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figure 1:

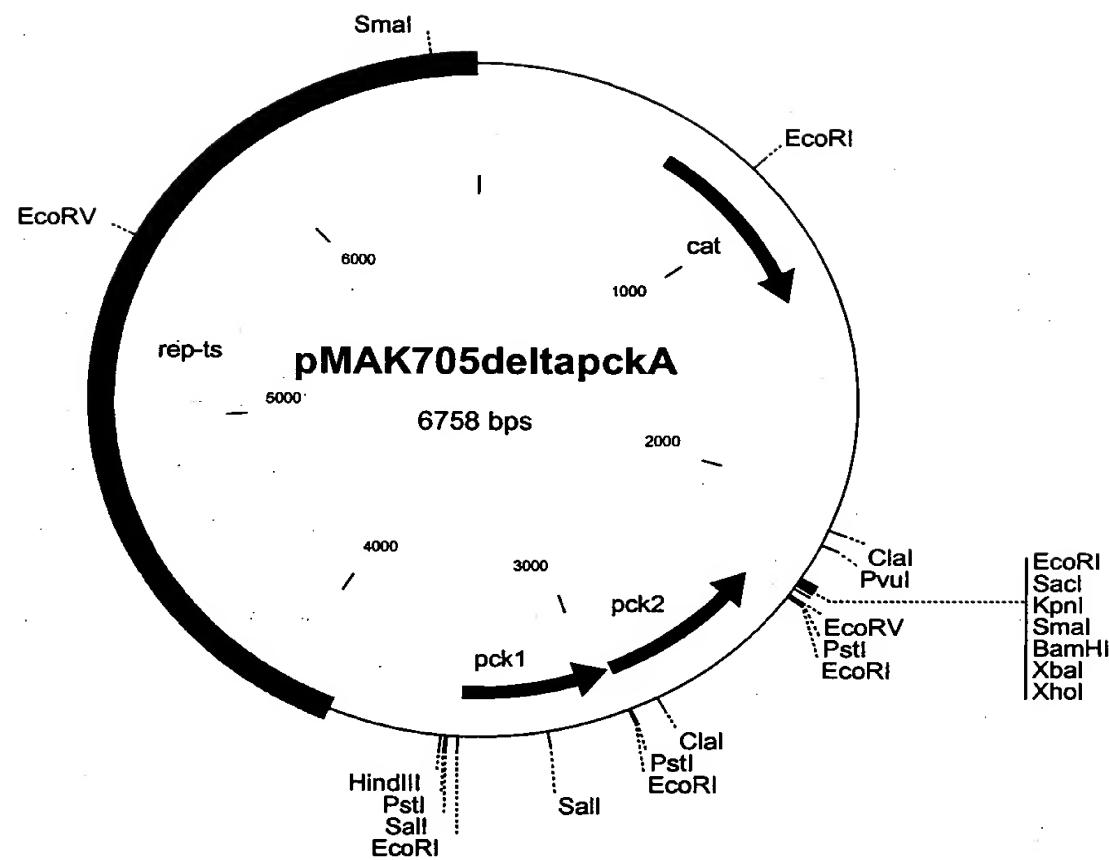


Figure 2:

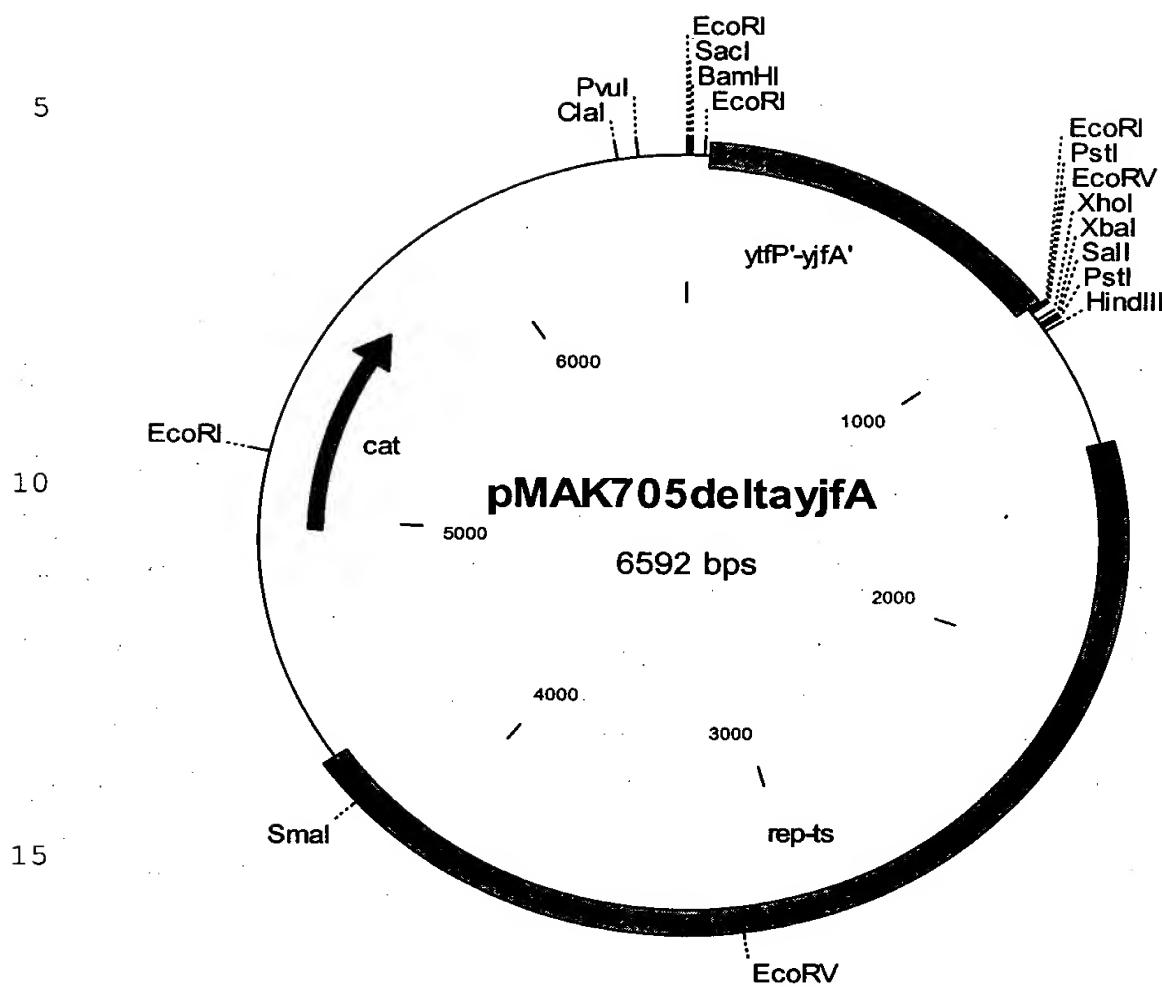


Figure 3:

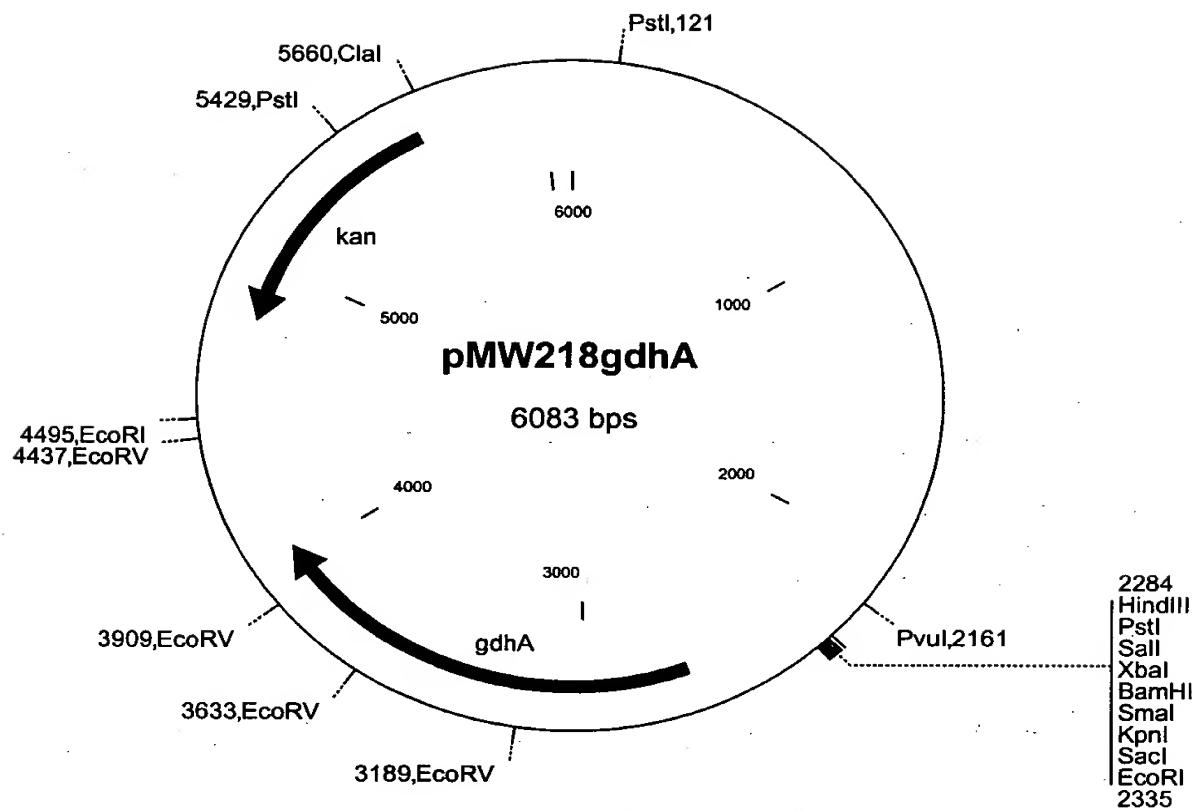
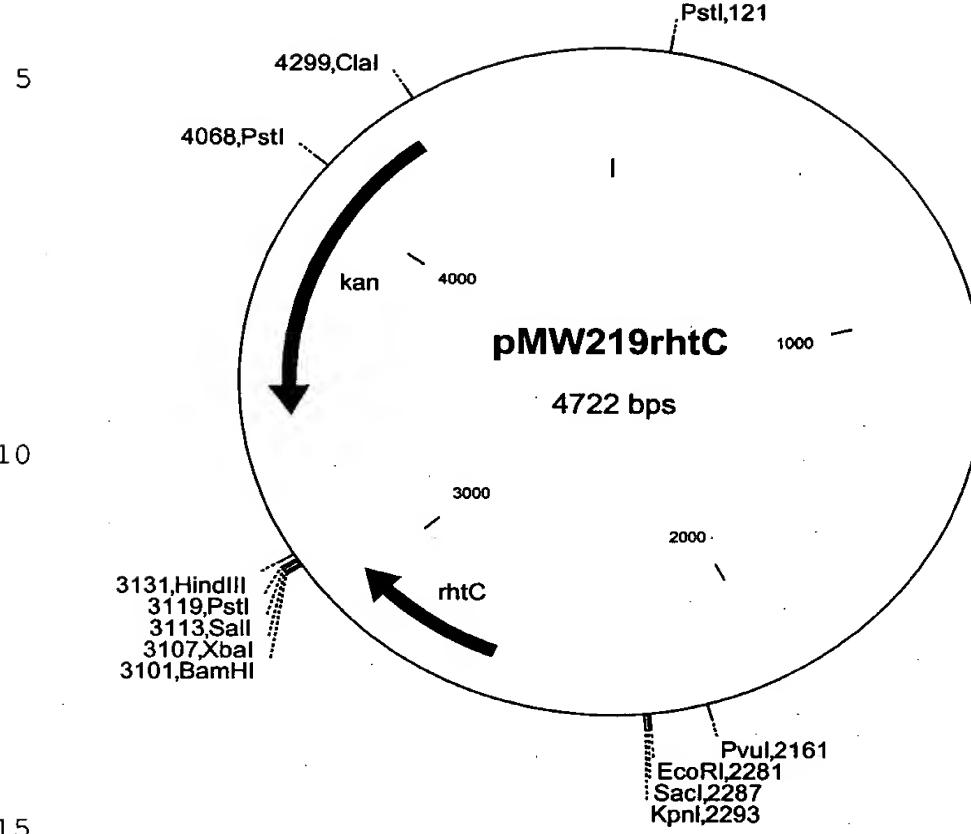


Figure 4:



15

20

Figure 5:

